

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号:

UDC _____

学 位 论 文

电喷雾离子源高分辨串级飞行时间质谱仪
(ESI-Q-TOFMS) 的研制
及其在中草药与生物大分子分析中的应用

何 坚

指导教师: 王 小 如 教授 (厦门大学化学系)

杨 芑 原 教授 (复旦大学化学系)

申请学位级别 博 士 专业名称 分析化学

论文提交日期 2002 年 4 月 论文答辩时间 2002 年 7 月

学位授予单位和日期 _____

答辩委员会主席 _____

评阅人 _____

2002 年 4 月

Ph. D Dissertation

**RESEARCH ON HIGH RESOLUTION TIME OF FLIGHT
SPECTROMETRY WITH ELECTROSPRAY
IONIZATION SOURCE**

By

He Jian

**Supervisors: Prof. Wang Xiaoru
 Prof. Yang Pengyuan**

Apr. , 2002

Department of Chemistry, Xiamen University

摘 要

与其它分析方法相比,质谱分析法具有灵敏度高、分析速度快、定性分析精确和信息量丰富等特点。它经过近百年的不断发展,从最初的同位素分析,到现在已经逐渐成为化学、地质学、生物化学、药理学、医学、石油化工、能源、环保和食品加工等许多方面不可缺少的分析检测手段,是分析科学领域中最重要工具之一。随着近代物理学、电子学、计算机、真空技术和机械加工技术的进一步发展,质谱仪的性能还在不断提高。

质谱仪主要有磁偏转式质谱、四级杆/离子阱式质谱(Q/IT-MS)、飞行时间质谱(TOF-MS)和富里叶变换离子回旋共振质谱(FTICR-MS)四种类型。而飞行时间质谱仪(TOF-MS),具有微秒级的快速检测速度、高离子传输率、高灵敏度、高质量测定精度和高分辨率,以及理论上无质量检测上限等众多优点,再加上生命科学的研究需要,电喷雾离子源(ESI)和基体辅助激光解析离子源(MALDI)的不断成熟,使它成为在近十年来发展最快、最具应用前景的一种质谱仪。

厦门大学现代分析科学教育部重点实验室自1994年以来一直专注于飞行时间质谱仪的研制工作,曾研制成功国内第一台微秒级脉冲辉光放电离子源飞行时间质谱仪(usGD-TOFMS)。本工作是从1998年开始的,在与俄罗斯质谱专家A.F.Dodonov的合作下,于2001年研制成功了一台垂直引入式电喷雾离子源高分辨飞行时间质谱,其主要性能指标已经达到了国际先进水平。该仪器具有以下特点:在离子调制区使用三组四极杆,有效地减少离子束的空间分散和能量分散;采用正负双脉冲排斥和离子垂直引入方式;经过优化设计的二级有网反射器;新颖的MCP安装方法。经初步调试,该仪器的最佳分辨本领已优于10,000,质量测定精度优于10ppm。

本论文共分五章。第一章概述质谱仪和飞行时间质谱仪的发展;第二章介绍飞行时间质谱的原理介绍,并对其主要性能参数进行了较详细的理论分析;

第三章介绍这台仪器的结构和制作过程；第四章介绍仪器的调试结果、主要性能指标，以及目前已经进行的一些实际应用；最后在第五章举出了目前仪器尚且存在的问题，并相应的改进设想。

关键词:

质谱仪、飞行时间质谱、分辨本领、质量测定精度、灵敏度、电喷雾离子源、射频四极杆、碰撞聚焦(离子冷却)、MCP、CFD、TDC、丹参

Abstract

Comparing with other analysis techniques, Mass spectrometry (MS) has many virtues, such as high sensitivity, high analysis speed, high accuracy of mass measurement and a great deal of information. After nearly a century development, its applications vary from isotope analysis preliminarily to Chemistry, Geology, Bio-chemistry, Pharmacology, Medicine, Petroleum chemistry, Energy, Environmental protection and Food process. It has been becoming indispensable instrument in these fields. With the development of physics, electronics, computer, vacuum technique and mechanics, the performance of MS is still improved continuously.

Up to now, there are four kinds of MS: Magnetic focusing MS, Quadrupole/Ion trap MS (Q/IT-MS), Time of flight MS (TOF-MS) and Fourier translation ion resonance MS (FTICT-MS). But TOFMS has many overcoming characteristics, such as fastest detect speed, high ion transmission, high sensitivity, high accuracy of mass measurement, high resolution and unlimited mass range theoretically. The demands of Life science analysis and the improvement of ion source (Electro-spray ion source and Matrix assisted laser desorption ion source) also urge TOFMS to develop faster. So TOFMS has been becoming the kind of mass spectrometer which develops fastest and has largest application foreground in recent ten years.

From 1994 we began to specialize in the development of TOFMS, and homemade out the first us-GD ion source TOFMS in China. From 1998, with the cooperation of Prof. A.F. Dodonov, we made out the second high

resolution TOFMS (ESI-Q-TOFMS) successfully in 2001. Its main performance has reached the national advanced level. This home-made instrument has a number of features as follows. It can be used as tandem MS (MS/MS) owing to three sects quadrupoles used in the ion modulation part; the TOFMS analyzer adopted positive-negative double extrusion pulse, orthogonal injection way; two grades ion reflector with grids designed by computer simulation, and new micro-channel plate (MCP) mounting method. This instrument has already been in working condition after preliminary adjustment, and the resolution over 10,000 was achieved.

This paper can be divided to five chapters. In chapter 1, the development history of MS and TOFMS are introduced. The principle of TOFMS is discussed in chapter 2. The structure of this instrument and the whole procession are described in chapter 3. The results and main performance parameters are listed in chapter 4. Some applications are also in this chapter. The last chapter is subjected in problems existed in this TOFMS, and some improvement methods are advised at the end of this chapter.

Key words:

Mass spectrometry, Time-of-flight mass spectrometry, Resolution, Sensitivity, Electrospray ionization, RF-only quadrupole, Ion reflector, Salvia miltiorrhiza Bage

目 录

摘要.....	I
Abstract	II
第1章 前言.....	1
1、质谱(Mass spectrometry)的发展	1
2、飞行时间质谱 (Time of Flight Mass spectrometry) 发展.....	2
3、目前国内外飞行时间质谱仪的进展.....	4
参考文献	8
第2章 仪器设计及理论分析	10
1. 飞行时间质谱仪的工作	10
1.1 直线式飞行时间质谱分析器与双场加速	11
1.2 反射式飞行时间质谱分析	12
2. 飞行时间质谱分析器的主要性能指标	15
2.1 质量分辨本领.....	15
2.2.1 初始条件分散.....	17
2.2.2 静电场的非均匀性.....	21
2.2.2.1 栅网.....	21
2.2.2.2 极片.....	22
2.2.3 其它条件的影响.....	23
2.2.3.1 离子信号的检.....	26
2.2.3.1.1 微通道板(Micro-plate Channel).....	27
2.2.3.1.2 阳极.....	28
2.2.3.1.3 时间-数字转换器 (TDC)	29

2.2.3.2 电源的稳定性.....	33
2.2.3.3 加工及装配精度.....	34
2.3 质量测定精度.....	34
2.4 测量绝对灵敏度.....	34
3. 液—质联用接口技术.....	35
3.1 液—质联用接口存在的主要问题	35
3.2 三种 LC-MS 离子源的比较	36
3.3 ESI 源的存在的主要问题及解决	39
3.3.1 重复性	39
3.3.2 灵敏度	40
参考文献	48
第三章 仪器结构与制作	50
1、真空系统	51
2、电喷雾离子源	52
3、离子调制系统	53
3.1 第一级射频四极杆	54
3.2 第二级射频四极杆	55
3.3 第三级静电四极杆	57
3.4 平板单透镜	58
4、飞行时间分析器	59
4.1 二级反射式飞行时间分析器的原理及优化设计	59
4.2 离子排斥与加速区	64
4.2.1 栅网	66
4.2.2 双排斥脉冲与补偿电压的计算.....	67
4.2.3 补偿电容的计算.....	68
4.2.4 微电流放大器.....	68
4.2.5 二级有网型反射器	70
4.2.6 离子检测器	71

4.3 信号采集与处理系统	73
参考文献.....	79
第四章 结果与应用	80
1、 仪器调试结果及主要指标.....	82
2、 实际应用.....	87
2.1 高分辨高精度 ESI-TOFMS 进行混合样品直接成分鉴定与分析	87
2.2 在中药分析中的应用	88
2.3 生物有机大分子的检测	99
参考文献	118
第五章 结论与展望	119
致谢	121
附录一 部分电路设计.....	122
附录二 部分机械图设计.....	129
附录三 攻读博士学位期间发表和交流的论文.....	136

第一章 前 言

1、质谱 (Mass spectrometry) 的发展

质谱仪是先将样品离子化,再通过预先设定的电场或磁场后,实现质荷比分离,并检测其相应峰强,从而达到对样品的定性、定量分析的一种精密现代分析仪器。

自 1912 年 J.J. 汤姆逊(J. J. Thompson)使用磁偏仪,证明氖有相对质量 20Da 和 22Da 两种同位素存在,到 1918 年 J. 丹普斯特(J. Dempster)和 1919 年 F. w. 阿斯顿(F. w. Aston)研制成功世界上第一台质谱仪以来,质谱法从最初的同位素分析,到现在已经逐渐成为化学、地质学、生物化学、药理学、医学、石油化工、能源、环保和食品加工等许多方面不可缺少的分析检测手段。为了满足不断提高的实验要求,同时随着近代物理学、电子学、计算机、真空技术和机械加工技术的快速发展,质谱仪无论在性能上,还是在功能上都取得了显著进步。

纵观质谱仪的发展历程,其中有两种技术对其发展起到了主要的推波助澜作用。首先是离子源技术:当每次新的离子源推出后,质谱仪就会进入新一轮的发展。最初的电子轰击源为气体和挥发性物质的检测铺平了道路,它们还一直沿用至今。上世纪三十年代,火花离子源的出现是质谱仪发展史中的一个重要里程碑。由于它对固体样品的检测灵敏度很高,再加上当时的历史背景,使得火花离子源质谱仪成为最早的商品化质谱仪。而在此之后的近四十年的时间里,由于离子源没有较大的变化,质谱仪的发展也进入了平缓期。但是到了七十年代末和八十年代初,短脉冲辉光放电离子源和电感耦合离子源与质谱仪的新组合,使得它又向前前进了一大步。随着离子源种类的不断丰富,使质谱仪在众多的分析仪器中占据着越来越重要的地位。

最可喜的是,近十几年来由于大气压化学(碰撞)电离源 APCI (Atmosphere Chemical /Collision Ionization)、基体辅助激光解吸离子源

MALDI(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)和电/离子喷雾离子源 ESI/ISI (Electrospray/Ionspray Ionization) 的不断成熟,使质谱仪发展到了前所未有的顶峰时期—生物质谱时代,它已成为分析和检测生物大分子最主要的手段之一。

另一个推动质谱发展的是联用技术:由于质谱仪器的定性分析是它的强项,但定量分析相对较弱。在与其它分析仪器联用中,色谱和质谱的联用占主导地位。上世纪七、八十年代 GC—MS 曾风靡一时,对混合气体的测定具有很高的精确度。而二十一世纪是生物工程时代,人们对物质的分析已经从无机元素分析逐步转向有机大分子分析,从常规的化学分析转向生物功能分析。显然 GC—MS 已不能胜任,势必由 LC/CE—MS 取而代之。目前 LC/CE—MS 已经成为生物质谱最主要的分析仪器。

目前常见的质谱仪种类主要有磁偏转式质谱、四级杆式质谱(Q-MS)、离子阱质谱(IT-MS)、飞行时间质谱(TOF-MS)和富里叶变换离子回旋共振质谱(FTICR-MS)五种。磁偏转式质谱的历史最悠久,从第一台质谱仪的诞生一直沿用至今。在质谱仪的发展初期,磁偏转式质谱仪担当着同位素分离与分析、元素原子量的校准以及无机成分鉴定等主要任务。尽管现在的磁偏转式质谱仪可以达到非常高的质量分辨率(>10 万),但是它笨重而庞大的机身、检测时间慢、质量检测范围窄和昂贵的价格都制约着它的发展,现已处在萎缩阶段。

四级杆式质谱体积小、结构简单,成本较低,技术上也日趋成熟,在商品质谱仪器中一直占有比较大的比重。离子阱质谱不仅保留了四极杆质谱的大部分优点,更重要的是它自身就可以完成多级质谱分析。这是其他任何一种质谱都不能比的。早期四级杆式质谱和离子阱质谱的分辨率不太高,但近几十年来,也有了不小进步,最好分辨率超过 4000。但是受到其自身工作原理的限制,分辨率很难再有大的突破,而且质量分析范围受限制,另外在某些时候,毫秒级的检测速度还不能满足要求。由于超导技术和富里叶变换技术的引入,富里叶变换离子回旋共振质谱是目前分辨率最高的质谱仪,但是它昂贵的价格和维护费用,还不能使它成为主流。

飞行时间质谱仪 (TOFMS) 以它微秒级的快速检测速度、高离子传输率、高灵敏度和精度, 以及理论上无上限质量检测范围等众多优点, 尤其是几年来 TOFMS 的在分辨率上有质的飞跃 (优于 10^4), 再配合 ESI/MALDI/APCI 等离子源, 使之成为当今最有发展前景的质谱仪。

2、飞行时间质谱 (Time of Flight Mass spectrometry) 发展

纵观飞行时间质谱仪 (TOFMS) 的发展式, 大致可以分成以下三个发展阶段:

早在 1946 年 Stephens 首次提出利用飞行时间来分离不同质荷比的离子, 两年后 Cameron 和 Eggers 设计了世界上第一台 TOFMS, 直线式飞行管长达十米, 但分辨率还不到 5。在以后的几年里 TOFMS 没有得到什么大的发展, 一直到 1955 年 Wiley 和 McLaren 发表了双场加速聚焦方法的报道, 使直线式飞行时间质谱仪的分辨率一下提高近两个数量级, 达到 100 以上。1957 年 Bendix Corporation 公司推出分辨率为 500 的商品仪器。这是 TOFMS 发展历程中一个非常重要的阶段, 因为至此 TOFMS 才真正走向商品化。但是双场加速只能实现一阶空间聚焦, 但是对离子的初始能量分散却无能为力。因此直线式 TOFMS 的分辨率很难有较大的突破。

TOFMS 在沉寂了近二十年后, 1971 年迎来了它的第二次革命, Mamyrin 利用反射电场实现了能量补偿和二阶空间聚焦, 使 TOFMS 的性能又提高了一大步, 分辨率达到 2000。上世纪八十年代末, 随着快电子技术、计算机技术和机械加工工艺的不断进步, TOFMS 的性能也不断提高。但是由于当时四极杆/离子阱质谱已经发展到一个非常成熟的阶段, 普及率非常高。而 TOFMS 在性能上和四极杆/离子阱质谱相比并没有什么优势, TOFMS 在制作上比四极杆/离子阱质谱复杂, 价格也要贵一些。因此 TOFMS 在质谱应用中的占有率一直没有太大进步。

一直到上世纪九十年代中, TOFMS 终于展露锋芒, 进入了一个前所未有的快速发展时期。究其原因, 主要有三个因素:

A、首先是仪器性能指标的提高。由于人们对 TOFMS 理解的不断深入,

一些新方法、新技术的不断引入，其中主要是双推斥脉冲、离子反射镜的优化设计、射频四极杆的碰撞冷却聚焦技术和高时间分辨的信号记录系统。TOFMS 的质量分辨率有很大提高，进入到 10^4 级别，这就和四极杆/离子阱质谱拉开距离，进入高分辨质谱的行列。另外，TOFMS 在分辨率的大幅度提高的同时，另一个非常关键的性能指标—质量测定精度也有了质的飞跃，已经达到 10ppm 级，最新的商品仪器达到了 5ppm。这比四极杆/离子阱质谱高出近 100 倍。质量测定的高精度和高分辨率对样品的定性分析非常有帮助，可以很好地鉴别分子量非常近似的离子 ($m/q < 10\text{mDa}$)，在某些时候混合样品甚至不用分离和做串联质谱，就可以达到主要的定性分析结果。

B、LC-MS 的发展以及电喷雾 (ESI) 和基体辅助激光解析 (MALDI) 等离子源与 TOFMS 的成功联用，这是 TOFMS 发展的另一个主要因素。ESI 离子是一种非常温和的软电离源，而且可以产生多电荷的离子，这就意味着在不用提高质谱仪的质量检测上限，就可以用原有的分析器分析大质量数的有机聚合物、大分子及生物样品。另外，ESI 是一种工作在常压下的离子源，而且是连续电离，与 LC/CE 等液相分析仪器可以很好地在线联用。MALDI 离子源也是一种软电离源，但它是非在线脉冲式离子源，它和 TOFMS 脉冲式的工作方式正好相匹配。

C、生命科学的兴起和发展对分析器提出了更高的要求。众所周知，蛋白质组学是国际生命科学研究的前沿，它已成为分析化学研究领域的最前沿研究热点，而生物质谱，是蛋白质组学的主要方法之一。对于生物质谱仪而言，它比一般无机、有机质谱要求更大的质量分析上限 ($>3\text{kDa}$)、更高的分辨率、灵敏度和质量分析精度。而现在的 TOFMS 恰好能满足这些要求。TOFMS 每个测量周期得到都是全谱，所有不同质量数的离子都同时检测，而且可以不断累加，而四极杆质谱是扫描谱，当测定某个质量数的离子时，其他离子就损失了，不能累加。因此随着基体辅助激光解吸离子源(MALDI)和电喷雾离子源(ESI)的不断成熟，ESI-TOFMS 和 MALDI-TOFMS 已成为分析和检测生物大分子的首选手段之一。

3、目前国内外飞行时间质谱仪的进展

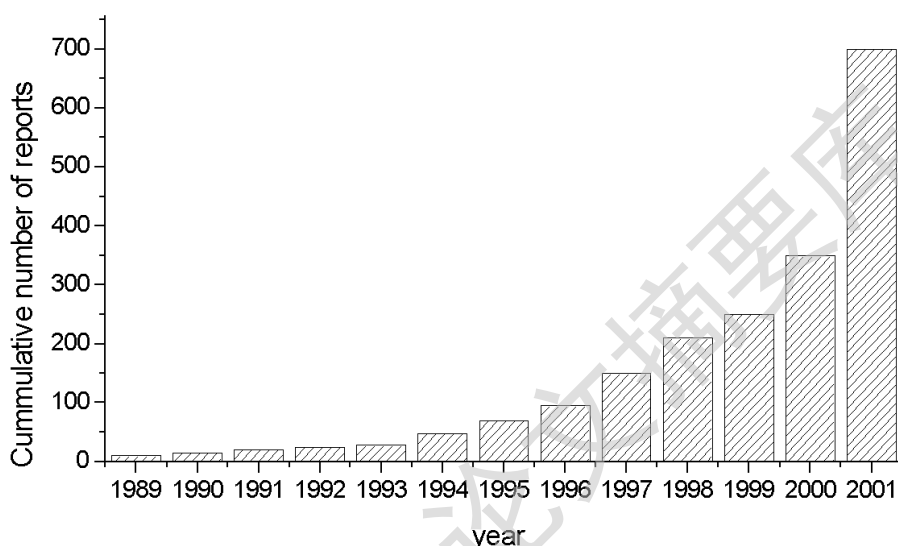


Figure 1-1. Growth in the number of reports of TOFMS instruments and applications from 1989 to 2001.

Fig. 1-1 反映了 TOFMS 受重视的程度是逐年递增。据有关报道,2000 年全球质谱的市场超过 10 亿美元。传统的质谱仪占领 4.5 亿美元,GC—MS 占 3.5 亿美元,LC—MS 占 2.5 亿美元。而且每年还以 12~15% 的速度快速增长。其中 LC—MS 的增长尤为显著,而在 LC—MS 中飞行时间质谱仪 (TOFMS) 更是发展迅猛,在 LC—MS 的增长比例中占 60%。

目前,商品化的 LC—TOFMS 几乎完全由国外厂家垄断。主要生产商是美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems Inc. Corp.), 美国布鲁可·道尔顿公司 (Bruker Daltonics, Inc.), 安捷伦 (Agilent Corp., 原 HP 公司) 和 Micromass 公司。并且,在世界各地预计还有近百家小型质谱厂商生产和研制 TOFMS。

根据仪器的功能及性能指标,可以把 TOFMS 分为三个普通/及型 ($R < 5000$ 无串级功能)、实验级 ($R > 10,000$) 和研究级 ($R > 15,000$, 带串级及专家数据分析系统)。Table 1-1 列出了一些当前有代表性的 TOFMS 产品。

Table 1-2 Representative Electrospray/Maldi time of flight mass spectrometers.

Product Model	LCT	Mariner	Q-TOF -Micro
Company	Micromass Corp. 100 Cummings Center,	PE Biosystems PerSeptive Biosystems 850 Lincion Center.	Micromass Corp. 100 Cummings Center,
MS type	MS	MS	MS/MS
Ion source	ESI ; APCI ; Nano ESI (10-1000nl/min)	High/low flow rate ESI Nano/micro ESI.APCI	Fast/low flow rate ESI, Nano/micro ESI, Negative / positive ion
Mass analyzer	3-m effective path length with two stage reflectron	2-m effective path length with two stage reflectron	<2-m effective path length with two stage reflectron
Detectors	Dual MCP /ADC	Dual MCP/TDC	Dual MCP / TDC
Mass range	>10,000 m/z	>10,000 m/z	>10,000 m/z
Mass resolution	5000 FWHM	5000 FWHM (500m/z)	>5,000FWHM
Mass accuracy (Internal calibration)	Better than 5ppm at 1G/s acquisitionRate.	10ppm	5ppm
Sensitivity	S/N>50 : 1 (10pg Reserpine)	10fmol Neurotensin , S/N>20 : 1	S/N>100 : 1 (10pg Reserpine)
Special features	Single lock-mass-correction exact mass measurement on the fly.	High throughout combinational Chemistry analysis package.	
Price (U.S. dollars)	\$20,000	\$25,000	

Follow up:

BioTOF-II Q	Q-TOF-API US	QSTAR Pulsar
Bruker Daltonics Manning Park 19 Fortune .	Micromass Corp. 100 Cummings Center,	Appliedbiosystems/Sciex 850 Lincion Center.
MS	MS/MS	MS/MS
Fast/low flow rate ESI, Nano/micro ESI, Negative / positive ion	Fast/low flow rate ESI, Nano/micro ESI, Negative / positive ion	API / oMALDI Micro/Nano IonSpray
3.5-m effective path length with two stage reflectron without grid.	3-m effective path length with two stage reflectron or three reflect times.	3.5-m effective path length with two stage reflectron
Dual MCP /TDC	Dual MCP / TDC	Dual MCP / 4 Anode /TDC
>10,000 m/z	>10,000 m/z	>10,000 m/z
>20,000FWHM	>10,000FWHM (MS) 17,5000(FWHM) (MS/MS)	>15,000FWHM
5ppm	5ppm	5ppm
Not applicable	Up to 20,000	Up to 20,000
Not sure	\$500,000	\$450,000

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库